Aus dem Hygienischen Institut der Universität Tübingen.
Vorstand: Prof. Dr. K. Wolf.

Über Farbstoffnährböden zur Züchtung von Typhus- und Parathyphus-Bazillen.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen
vorgelegt von

Erich Unseld
aus Ulm a. D.

Druck der Buchdruckerei Eugen Göbel in Tübingen
1930

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät
der Universität Tübingen.

Dekan: Prof. Dr. Kohlrausch.

Referent: Prof. Dr. Wolf.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern.

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät
der Universität Tübingen.

Dekan: Prof. Dr. Kohlrausch.

Referent: Prof. Dr. Wolf.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern.

Über Farbstoffnährböden zur Züchtung von Typhus- und Paratyphusbazillen.

Die Entdeckung des Typhusbazillus durch Eberth im Jahre 1880, mehr noch die erste Gewinnung einer Reinkultur durch Gaffky 1884 wiesen der Typhusforschung grundlegend neue Wege. Das eingehende Studium der morphologischen und biologischen Eigenschaften des Typhuserregers einerseits, der ihm nahestehenden Bakterienformen andererseits, ließ die Möglichkeit erhoffen, durch Züchtung der Erreger aus dem Blut und den Ausscheidungen von Typhuskranken beweisende diagnostische Schlüsse zu ziehen, sowie Bazillenträger und Dauerausscheider mit Sicherheit zu erfassen. Daß dies wiederum von hoher Bedeutung für die Bekämpfung und Vorbeugung der Seuche war, leuchtet ohne weiteres ein. 1885 konnte erstmals Pfeiffer den Erreger aus dem Stuhl von Typhuskranken züchten, und seither sind eine Unmenge von Verfahren für diesen Zweck ausgearbeitet worden.

Alle diese Bemühungen und jede systematische bakteriologische Typhusdiagnostik müssen sich aufbauen auf Kenntnis und Würdigung der spezifischen Eigenschaften des Erregers, insbesondere auf Vergleich und Abgrenzung gegenüber anderen nahestehenden Bakterienformen.

Der Typhusbazillus ist ein plumpes, kurzes Stäbchen mit abgerundeten Ecken, 2,5—3 μ lang; er besitzt 10—12 durch besondere Färbemethoden (z. B. Zettnow, Bunge) darstellbare Geißeln, die ihm eine sehr lebhafte Bewegungsfähigkeit vermitteln. Von den Bakterien der normalen Darmflora zeigt das B. coli commune, unter den pathogenen Darmbakterien die Paratyphuserreger weitgehende Ähnlichkeit mit dem B. typhi. Diese übereinstimmenden morphologischen Eigenschaften führten zur Aufstellung einer Typhus-Coli-Gruppe, die gegenüber anderen Bakteriengruppen durch die Entfärbung nach Gram leicht abgrenzbar ist. Der Gruppe gehören zahlreiche pathogene und nichtpathogene Bakterienarten an, so vor allem das Bakt. typhi, Bakt.

paratyphi A und B, Bakt. enteritidis Gärtner, Bakt. coli commune, Bakt. alcaligenes u. a. Für die Aufgaben der praktischen Diagnostik kommen vorwiegend B. typhi, B.paratyphi B und B. coli commune in Betracht.

Man hat versucht, die schnellere Beweglichkeit des Typhusbazillus gegenüber dem B.coli zur Trennung zu verwerten; (Gabritschewsky, Landmann u. a.) doch haben die hiefür angegebenen Methoden nie Geltung erlangt.

Während also aus Form und Beweglichkeit keine spezielle Diagnostik des Typhusbazillus hergeleitet werden kann, bieten die biologischen Eigenschaften eine bessere Handhabe für seine Isolierung.

B. typhi wächst am besten bei 37° C. und leicht alkalischen oder leicht sauren Nährböden (Kitasato (1)); wird Temperatur und Säurestufe verändert, dann wächst es weniger gut. Auf Agar und Gelatine wachsen zarte, weinblattförmige Kolonien, ohne den Nährboden zu verflüssigen. Die Kartoffelkultur, die von Gaffky als für den Typhusbazillus besonders bezeichnend angesehen wurde, besitzt infolge ungleichmäßiger Ergebnisse ihre alte Gültigkeit nicht mehr. Auch in Boullion und flüssigen Nährmedien wächst der Typhusbazillus gut; jedoch sind diese Nährböden für die Beimpfung mit Bakteriengemischen, wie Vignati (2) zeigen konnte, ungeeignet. In Auswirkung des Antagonismus zwischen B. typhi und B.. coli wird dabei der anspruchsvollere Typhusbazillus im Wachstum unterdrückt.

Ein unterschiedliches Verhalten zwischen dem B. coli einerseits und allen übrigen Angehörigen der Typhus-coli-Gruppe fand Kitasato (3) bezüglich der Indolbildung: B. coli allein bildet nach einigen Tagen in Boullion- oder Peptonwassernährböden Indol, dessen Nachweis durch Rotfärbung eine Abgrenzung des B. coli commune ermöglicht.

Ein weiteres für die Differentialdiagnose sehr wichtiges Verhalten wurde gegenüber verschiedenen Zuckernährböden beobachtet. Die Tatsache, daß B. coli den Milchzucker unter Säurebildung zersetzt, B. typhi ihn nicht verändert, wurde in einigen sehr brauchbaren Nährböden verwertet. Petruschky (4) gab in seiner Lackmusmolke ein Verfahren an, in dem der Indikator Lackmus die aus Milchzucker durch B. coli gebildete Säure durch Rotfärbung vor Augen führt; B. paratyphi B verursacht leichte rotviolette Färbung, während B. typhi den Nährboden unverändert läßt. Eine heute noch sehr gebräuch-

liche Modifikation dieses Verfahrens ist Drigalski und Conradi's (5) Agar, dessen Anwendung im Prinzip auf Säurebildung des B. coli aus Milchzucker und dadurch hervorgerufener Lackmusrotfärbung beruht, während B. typhi und B. paratyphi B zunächst die Eiweißstoffe angreifen und in lackmusblauen glasigen Kolonien wachsen. Bei dem sehr brauchbaren Endo'schen (6) Nährboden besteht die Unterscheidung darin, daß auf dem durch Na-Sulfit entfärbten Fuchsin-Nährboden Typhus- und Paratyphus B-Bazillen den Milchzucker unverändert lassen und farblos wachsen, B. coli dagegen durch Säurebildung mit der Leukobase des Fuchsins zusammen wieder intensive Rotfärbung ergibt.

Hinsichtlich der Funktion der Gasbildung aus Traubenzucker steht das Verhalten des Typhusbazillus allen anderen Gruppengenossen gegenüber vereinzelt da: B. typhi allein bildet kein Gas, eine Tatsache, die in den Methoden von Smith (7) und Germano und Maurea (8) verwertet, praktisch noch heute zu dem gleich zu erwähnenden Neutralrotagar als Traubenzuckerzusatz verwendet wird.

Beim Wachstum in der Milch konnte Widal (9) bei B. coli Gerinnung beobachten, die bei B. typhi und paratyphi niemals eintritt.

Weiterhin fanden Scheffler und Rothberger (10) im Neutralrot einen Farbstoff, der von B. coli und paratyphi B reduziert und entfärbt wird, während B. typhi diese Eigenschaft nicht besitzt. Der modifizierte Traubenzucker-Neutralrotagar, der durch Entfärbung, Fluoreszenz und Gasbildung weitgehende Differenzierung der einzelnen Arten der Typhus-Coli-Gruppe erlaubt, hat sich als sehr brauchbar erwiesen.

Die zahlreichen bisher genannten Methoden, die auf Erkenntnis biologischer Eigenschaften der einzelnen Bakterienarten fußen, leisten für den Identifizierungsdienst innerhalb der Typhus-Coli-Gruppe recht Befriedigendes. Praktisch haben sich besonders die Nährböden von Endo, Drigalski-Conradi und das Neutralrotverfahren bewährt. Zusammen mit der Agglutinationsprobe, der auf der Antigennatur des Typhus- oder Paratyphusbazillus aufgebauten spezifischen Serumreaktion, reichen die obigen Methoden vollkommen aus, um eine fragliche Bakterienkultur sicherzustellen. Auch für die Diagnostik des Typhusbazillus aus dem Blut bedarf es nach Anreicherung in der ausgezeichneten Rindergalle keiner weiteren Methoden mehr.

Anders steht es bei den praktischen Bedürfnissen der Typhusdiagnostik aus Stuhl und Urin. Dabei sind Schwierigkeiten zu bewältigen, denen die genannten Züchtungs- und Unterscheidungsverfahren nur in der Hand des sehr geübten Untersuchers gewachsen sind. Die Züchtung der Paratyphusbazillen ist weniger schwierig; deshalb wollen wir unser Augenmerk vorwiegend der Darstellung der Typhusbazillen zuwenden.

Im Bakteriengemisch einer zu untersuchenden typhusverdächtigen Stuhlprobe findet sich zumeist das B. coli gegenüber dem B. typhi in gewaltiger zahlenmäßiger Überlegenheit. So können häufig im Ausstrich die gesuchten Typhusbazillen vor dem anspruchsloseren B. coli-Partner nicht zur Geltung kommen. Die kleinen Typhuskolonien können zwischen den zahlreichen anderen nur schwer oder gar nicht erkannt werden, weil der Farbenunterschied durch Diffusion des B.coli anzeigenden Rotfarbstoffes in den Bereich der Typhuskolonien hinein fortfällt. Diese Schwierigkeiten sind umso größer, je geringer der Bruchteil der Typhusbazillen in der geringen Menge des Untersuchungsmaterials ist. Man hat versucht, durch minimale Ausstrichmengen eine reinlichere Trennung zu erzielen. Dies kommt aber einer weiteren Verringerung des untersuchten Materials gleich und engt so die Erfolgsquote ein.

Diese Verhältnisse ließen schon lange die Forderung entstehen, bei der Züchtung das Wachstum der Begleitbakterien zurückzudrängen, mit andern Worten, einen elektiven Typhusnährboden zu schaffen, welcher eine relative Anreicherung der Typhusbazillen erzielte. Dieser Nährboden erstrebt Wachstumshemmung oder gar Abtötung aller neben dem gesuchten Bakterium vorhandenen Keime, Förderung oder doch Indifferenz gegenüber dem Wachstum des zu züchtenden Erregers. Für die Typhusdiagnostik lautet die Forderung: Hemmung des B. coli, unbehindertes Wachstum des Bakterium typhi. Ein idealer Elektivnährboden würde noch den Vorteil bieten, daß bei überhaupt einmal aufgetretenem Wachstum die Art des gewachsenen Bakteriums sogleich als B. typhi erkannt würde, eine Abgrenzung gegen andere Keime nicht mehr erforderlich wäre. Von diesem Ideal sind wir freilich noch weit entfernt.

Das wirksame Prinzip eines solchen Nährbodens beruht auf verschiedener Resistenz der einzelnen Bakterienarten gegenüber gewissen Zusätzen zu den gewöhnlichen Nährböden. Diese Resistenz der ein-

zelnen Bakterienarten, d. h. ihr Widerstand gegen die hemmenden Einflüsse des Zusatzstoffes, ist aber nicht für alle solchen Zusatzstoffe gleichartig. An sich ist das B. coli im Wachstum am anspruchlosesten, hat also vielen Stoffen und Bedingungen gegenüber eine große Resistenz. Man hat aber auch Stoffe gesucht und gefunden, bei denen die B. coli-Resistenz gering, die B. typhi und vor allem B.paratyphi-Resistenz größer ist. Am besten geeignet für die elektive Typhusbazillenzüchtung wird also ein Zusatzstoff sein, der einen möglichst großen Resistenzunterschied oder -Abstand zwischen B. typhi und paratyphi einerseits, B. coli andererseits aufweist; mit anderen Worten ein Stoff, der in relativ geringer Konzentration das B. coli Wachstum schon unterdrückt, in relativ hoher Typhus- und Paratyphusbazillen im Wachstum noch nicht beeinträchtigt. Dieses Optimum also gilt es anzustreben.

Neben der Änderung der Konzentration des Zusatzstoffes ist eine zweite Variante, die von größtem Einfluß auf die Resistenzverhältnisse ist, in dem Säure- oder Alkalitätsgrade des Nährbodens zu berücksichtigen. Auch hierin zeigen sich die einzelnen Stoffe verschieden (Kitasato (1)). Erschöpfend wird also die Aufgabe nach einem idealen Elektivnährboden für Typhusbazillen gelöst: erstens durch Wahl geeigneter Zusatzstoffe, zweitens durch geeignete Konzentration derselben, drittens durch geeignete Säurestufung, die praktisch meßbar in der Wasserstoffionenkonzentration des Nährbodens zum Ausdruck kommt.

Von solchen Zusatzstoffen zu den Nährböden wurden die verschiedensten ausprobiert. Capaldi (11) empfahl Zusatz von NaCl und KCl zu seinen Nährböden, Elsner (12) Jodkali, Kruse (13) Karbolsäure, Remy (14) Asparagin, Zitronen-, Oxal- und Karbolsäure. Mac Concey (15) gab taurocholsaures Natrium an, nachdem Conradi (16) in der Rindergalle für die Blutkultur ein Mittel gefunden hatte, das bei Zurückdrängung der Colikeime einen hervorragenden wachstumsfördernden Einfluß auf die Typhusbazillen ausübte. Gaethgens (17) konnte durch Zusatz von chemisch reinem Coffein zu seinen Nährböden seine Ergebnisse wesentlich verbessern, und Hoffmann und Ficker (18) wandten dieses Verfahren mit Erfolg in ihren Vorkulturen zur Typhusbazillenanreicherung an. Aber bei der genaueren Untersuchung aller dieser Verfahren fand man, daß ihnen entweder Fehler anhafteten, oder die Unterschiede in der Wachstumsbeeinflussung zur praktischen Auswertung zu gering und unzuverlässig waren. Heute,

wo wir in den Farbstoffzusätzen bessere Mittel besitzen, sind sie größtenteils ganz in Vergessenheit geraten.

Als erste machten Drigalski und Conradi (5) von der bakteriziden Wirkung der Farbstoffe Gebrauch, indem sie durch Zusatz von Kristallviolett 1:100 000 zu ihren Lackmusmilchzuckernährböden einen Teil der Begleitbakterien des B. typhi und paratyphi durch Wachstumshemmung auszuschalten suchten. Auf den Versuchen über die bakterizide Wirkung der Anilinfarbstoffe aufbauend fand Löffler (19) im Malachitgrün Höchst in besonderen Konzentrationen ein gutes Mittel, das das Wachstum des B. coli hemmte, ohne das des Typhusbazillus zu beeinflussen. Löffler selbst modifizierte das Verfahren verschiedene Male. Leuchs (20) gab besondere Vorschriften dazu an, Lentz und Tietz (21) führten das Verfahren, mit besonderen Angaben versehen, als Anreicherungsmethode für Typhusbazillen aus dem Stuhl ein. Das Malachitverfahren bedeutet nach übereinstimmender Ansicht aller Autoren einen wesentlichen Fortschritt und hat weitgehende Verbreitung gefunden. Vielfach gilt es als Verfahren der Wahl und wird unten noch eingehend gewürdigt werden. Daß aber auch dieses Verfahren nicht ganz befriedigt, beweisen die zahlreichen Modifikationen, die empfohlen worden sind. Kindborg (22) kombinierte Malachitgrün mit Säurefuchsin, Löffler mit Reinblau-Safranin, Padlewski (23) nach Art des Endo'schen Nährbodens durch Entfärbung mit Na-Sulfit, Bitter (24) gab einen Chinablau-Malachitgrünagar an. Auch andere ähnliche Grünnährböden wurden empfohlen und sind heute vielfach gebräuchlich: Chinagrünagar nach Werbitzki (25), Pikrinsäure-Brillantgrünagar nach Conradi (26). Dieser Autor sah bei Durchuntersuchung von 400 Farbstoffen von dem obengenannten Verfahren die besten Erfolge. Andere Farbstoffnährböden mit elektiver Bakterienwirkung sind die nach Mandelbaum (27), der bei der Rosolsäure eine abtötende Wirkung gegenüber allen Begleitbakterien annimmt. Neuerdings hat Arisawa (28) ein Verfahren mit Pyoctanin-Na-Sulfit-Metachromgelbnährböden zur Isolierung der Typhusbazillen empfohlen, wobei B. coli gehemmt wird. Ein Croceinnährboden von Ishiyama (29) soll der Differenzierung von Paratyphus A und B-Bazillen dienen.

Auf Grund der allgemeinen, insbesondere auch chemotherapeutischen Bedeutung, die die Resistenzverhältnisse der Bakterien gegenüber Farbstoffwirkungen gewonnen haben, ging Sartorius (30) in einer

größeren Arbeit auf diese Farbstoffwirkungen grundlegend ein. Er ging von den bisher schon als wirksam erprobten Farbstoffen (Malachitgrün, Brillantgrün usw.) aus und untersuchte zahlreiche bekannte Farbstoffe, die, ebenfalls Angehörige der Triphenylmethanreihe, den bisher benuzten chemisch sehr nahestehen. Er sagte sich, daß die bisher benutzten Stoffe im Hinblick auf die Brauchbarkeit zur Typhusbazillen-Elektivzüchtung noch nicht die besten waren und, was die Resistenzabstände zwischen B. typhi und B. coli betraf, durch andere Farbstoffe übertroffen wurden. Ähnliche Überlegungen führte Sartorius auch dazu, benachbarte Farbstoffklassen mit zur Untersuchung heranzuziehen. So hat er eine große Zahl von Farbstoffen aus verschiedenen Klassen seinen Resistenzbestimmungen gegenüber B. coli, B. typhi und B. paratyphi und teilweise auch Ruhrstämmen unterworfen. Die geprüften Farbstoffklassen sind: Azine, Oxazine, Di- und Triphenylmethane, Akridine, Chinoline, Thioflavine, Nitrofarbstoffe, Xanthonfarbstoffe, Thiazinfarbstoffe, Azofarbstoffe und Alizarine. Seine Ergebnisse, die uns hier nur hinsichtlich der Auswertung für die elektive Typhus- und Paratyphusbazillenzüchtung interessieren, gipfeln in der Forderung, an Stelle der bisher gebräuchlichen Grünnährboden (Malachitgrün, Brillantgrün usw.) andere Farbstoffzusätze zu verwenden, die den an einen Elektivnährboden gestellten Anforderungen besser entsprechen. Die von Sartorius in einer zweiten Arbeit (31), mit genaueren Angaben erläutert, empfohlenen Farbstoffe Türkisblau, Dahlia B und Resorzinschwarz gehören wie die bisherigen Grünmarken in die Di- und Triphenylmethanreihe; das Akridinrot B gehört zu den Xanthonfarbstoffen. In der Annahme, durch Mischung zweier Farbstoffe eine Summation der elektiven Typhusbazillenwirkung, eine Halbierung aber der immer auch vorhandenen Typhusbazillen hemmenden Komponente des einzelnen Farbstoffes zu erzielen, gibt Sartorius unter den oben genannten Farbstoffen geeignete Kombinationen an. Er hat damit angeblich gute Erfolge gehabt.

Bei der großen praktischen Bedeutung, die diese Methoden von Sartorius für jedes bakteriologische Laboratorium haben, ist es wohl angezeigt, sich näher damit zu befassen. So verlockend es ist, sich über einen Fortschritt auf dem Gebiet der Elektivzüchtung von Typhusbazillen aus dem Stuhl zu freuen, so kritisch muß die Würdigung des neuen Verfahrens im Vergleich zu den bestehenden erfolgen.

Die Beurteilung darf sich nicht auf Ergebnisse mit Reinkulturen beschränken, sondern muß auch die praktische Seite genügend beachten. Barth (32) hat die Methoden einer Nachprüfung unterzogen, im wesentlichen jedoch nur auf die praktische Seite, die Züchtung aus dem Stuhl, abgestellt. Um eine möglichst vielseitige Beleuchtung der Frage zu garantieren, wollen wir hier so vorgehen, daß wir uns zuerst mit dem Problem des Elektivnährbodens überhaupt befassen, die Grenzen seiner Leistungsfähigkeit untersuchen, seine Berechtigung erweisen, um dann alte und neue Methode vergleichend zu beschreiben.

Gehen wir zunächst auf die Wirkungsweise der Elektivnährböden ein. Wodurch wirkt denn der Farbstoff elektiv? Grundsätzlich wirkt der Farbstoff einfach bakterizid und zwar je nach seiner Konzentration verschieden stark, aber prinzipiell schädigend auf alle Bakterienarten. Die Unterschiede der Wirkung und damit der Resistenz kommen wesentlich erst durch Hinzutreten der Säurungsvariante hinzu. Nach den Untersuchungen von Knorre (33) über die Malachitgrünnährböden und ihre Wirkungsweise setzt sich der Farbstoff mit Laugen zusammen in eine Farbbase um, der geringe bakterizide Kraft zukommt. Die Alkalisierung des Farbstoffnährbodens kommt also ceteris paribus einer Herabsetzung seiner absolut hemmenden Wirkung gleich. Dies finden wir in allen Versuchen mit Farbstoffnährböden bei Wechsel der p h Ionenkonzentration bestätigt (Tabellen von Sartorius (31) und Kilian (34)). Auf den gewöhnlichen eiweißhaltigen Nährböden ohne Zuckerzusatz greifen B. typhi und B. paratyphi die Eiweißstoffe an und bilden Alkali; dieses wandelt den Farbstoffzusatz in seine Farbbase um und vermindert die wirksame Farbstoffmenge. Säurebildende Bakterien, so vor allem B. coli, vermehren durch Rückverwandlung der Farbbase in wirksamen Farbstoff dessen Menge. Typhus- und Paratyphusbazillen vermindern also durch Alkalibildung die hemmende Farbstoffwirkung, B. coli dagegen vermehrt sie durch Säurebildung. Darin liegt das Wesen der unterschiedlichen Resistenzen; im Grunde genommen wird also auch bei der Elektivzüchtung das verschiedene Verhalten von B. typhi und B. paratyphi einerseits, B. coli andererseits in Bezug auf Säure- bzw. Alkalibildung verwertet.

Auch der Resistenzbegriff bedarf noch einer näheren Erläuterung. Wir haben oben auf Grund der geführten theoretischen Erwägungen zum Prinzip des Elektivnährbodens die Resistenzgrößen der einzelnen

Bakterienarten als feststehende Größen angenommen. Man hat gefunden, daß diese Annahme keineswegs zutrifft (Raubitschek und Natonek (35)). Eine Bakterienart, z. B. das B. typhi ist nicht als gleichbleibende Einheit zu betrachten, sondern als Sammelname für eine große Zahl von einzelnen Stämmen, die zwar hinsichtlich der spezifischen Eigenschaften übereinstimmen, aber graduell je nach dem Stamme beträchtliche Schwankungen aufweisen. Dies gilt besonders auch für die Resistenzverhältnisse. Also hat eine Bakterienart nicht einen bestimmten Resistenzwert, sondern eine größere Resistenzbreite. Diese Verhältnisse erschweren unser Bestreben nach „großen und reinlichen Resistenzabständen", wie Sartorius sie fordert, außerordentlich; ja es hat sich gezeigt, daß gerade bei B. typhi und B. coli ein teilweises Übereinandergreifen der Resistenzbreiten immer als Hemmschuh einer reinlichen Trennung bestehen bleibt (Vial (36), Fürth (37)). Bringen wir durch Steigern der Konzentration alle B. coli Stämme zur Hemmung, so unterdrücken wir damit auch die wenig resistenten B. typhi Stämme. Unter diesen Umständen ist es zweifellos besser, wir hemmen zwar nur den Großteil der B. coli Stämme, erhalten uns aber alle B. typhi Stämme am Wachstum. Eine Einengung des Typhusbazillenwachstums auf Kosten der „reinlichen Resistenzabstände" würde dem Sinn des Verfahrens zuwiderlaufen. Die noch gewachsenen Kolonien des B. coli sind dann sekundär durch das Endo- oder Drigalski-Verfahren abzusondern.

Wird uns also die Hoffnung auf einen idealen Elektivnährboden mit vollkommener Trennung aller Stämme durch die genannten Schwierigkeiten weitgehend zunichte gemacht, so wird der Farbstoffnährboden als zuverlässige Vorkultur, die doch wenigstens den Großteil der B. coli Stämme zurückhält, in seinem Wert nicht geschmälert. Wir erreichen zwar keine absolute, wohl aber eine relative Anreicherung der Typhusbazillen.

Haben wir eben von den Resistenzunterschieden bei den einzelnen Stämmen einer Bakterienart gesprochen, so müssen wir hier noch kurz auf die Abwandlung der Resistenz durch die Kultur in vitro eingehen. Verschiedene Forscher, Raubitschek und Natonek (35), Sartorius (30), Levi und Gaethgens (38), haben darauf hingewiesen, daß die Resistenz reingezüchteter Stammkulturen den Farbstoffnährböden gegenüber viel größer ist, als die frisch aus dem Stuhl entnommener Keime. Die Reinkulturen haben sich durch das fort-

während Wachstum auf künstlichen Nährböden gewissermaßen schon domestiziert. Die Erscheinung, daß sich die Bakterien an veränderte Wachstumsverhältnisse anpassen, wird auch durch die Festigung verschiedener Stämme gegenüber Farbstoffen bewiesen (Sartorius (30), Kolle (39) u. a.). Wir müssen uns dieser Tatsachen bei Übertragung unserer Versuchsergebnisse mit Reinkulturen auf die praktische Stuhluntersuchung stets erinnern.

Gehen wir nun an die Beurteilung der Leistungsfähigkeit der Elektivnährböden heran, so gilt es, zunächst die allgemeinen Gesichtspunkte dabei zu berücksichtigen. Suchen wir einmal die natürlichen Grenzen, die dem Verfahren überhaupt gesteckt sind, auf. Wir werden sehen, daß sie ziemlich eng gezogen sind. Der größte Mangel, der dem Verfahren anhaftet, besteht in der Tatsache, daß im Verhältnis zur gesamten Menge des Stuhles jedesmal nur außerordentlich geringe Mengen des Untersuchungsmaterials erfaßt werden. Zwar sind die früheren Züchtungsverfahren hierin eher noch etwas schlechter gestellt, aber die Tatsache eines absoluten Mangels des Verfahrens wird dadurch nicht berührt. Während im Höhestadium der Erkrankung allerdings die Typhusbazillen im Stuhl so zahlreich sind, daß auch im Bruchteil einer Öse der Stuhlprobe für den Nachweis genügend Bazillen vorhanden sind, so ist in anderen Perioden der Erkrankung diese Reichhaltigkeit der Stühle an Bazillen nicht gegeben. In den flüssigen typischen Typhusstühlen ist die gleichmäßige Verteilung vorhandener Typhusbazillen für den Ausstrich so geringer Mengen günstig. Bei festen Stühlen müssen ungleichmäßige Verteilung vorhandener Typhusbazillen, geringere Anzahl derselben oder längeres Herumstehen der Stuhlprobe z. B. beim Transport häufig zu negativen Ergebnissen führen, da bereits das Ausstrichmaterial unzulänglich ist. Hoffmann und Ficker (18) haben gezeigt, daß es auch unter günstigen Verhältnissen bei künstlicher Einsaat nur möglich ist, die Typhusbazillen noch aus dem Bakteriengemisch des Stuhles zu züchten, wenn das Verhältnis zu den Begleitbakterien nicht unter 1:300 sinkt. Die angeführten Mängel engen die Erfolgsgrenzen ganz beträchtlich ein. Dies zeigt uns am besten ein vergleichender Blick auf die ideale Peptonmethode zur Anreicherung der Choleravibrionen, wo eine größere Menge Untersuchungsmaterial verwertet und eine absolute Anreicherung in der Vorkultur erzielt wird. Ein weiterer Mangel, der im Prinzip des Verfahrens verankert ist, besteht darin,

daß durch die Farbstoffe in gewissem Grade immer auch die Typhusbazillen gehemmt werden (Vial (36)); sie werden nur weniger gehemmt als die Begleitbakterien und darauf beruht, wie oben dargetan, das Zustandekommen der Resistenzabstände. Die Schwächen, die dem Elektivzüchtungsverfahren überhaupt anhaften, lassen uns verstehen, daß uns noch manche Typhusdiagnose aus dem Stuhl entgehen muß und daß ein- oder mehrmaliges negatives Ergebnis das Vorhandensein des Typhusbazillus noch nicht ausschließt.

Wir werden nun zu der Frage gedrängt, ob nach den genannten Mängeln überhaupt noch ein Vorteil der Elektivverfahren vor den einfachen Differenzierungsmethoden nach Endo, Drigalski-Conradi und dem Neutralrotverfahren besteht. (Den Farbstoffen bei den drei letztgenannten Methoden kommt keine hemmende Elektivwirkung zu, sondern sie dienen nur zur Kenntlichmachung der verschiedenen Bakterienarten; lediglich der Kristallviolettzusatz zum Lackmusmilchzuckeragar dient der Hemmung der Begleitbakterien.) Wir werden diese Frage dahin beantworten müssen, daß ein Vorteil der Elektivplatten zweifellos ist, die Leistungsgrenzen der beiden Verfahren sich aber nicht vollkommen decken. Die Farbstoffplatte wird in manchen Fällen positive Ergebnisse erzielen, wo Endo- und Drigalski-Conradi-Verfahren versagen, aber es gibt auch Fälle, die sich umgekehrt verhalten. Die Farbstoffplatte ermöglicht durch Zurückdrängen der Hauptmenge der Bakterien die Verwendung einer größeren Menge von Untersuchungsmaterial und ein sicheres Erfassen einmal gewachsener Typhusbazillenkolonien. Auf der Endo- und Drigalski-Conradi-Platte ist es selbst bei minimalen Ausstrichmengen möglich, von B. coli-Kolonien verdeckte B. typhi-Kolonien zu übersehen. Die Farbstoffplatte kann durch, wenn auch geringe, Typhusbazillenhemmung bei bazillenarmen Stühlen zum Versager werden. Der Wert der Elektivplatten muß also anerkannt werden. Sie ersetzen zwar, auch in ihrer eingeschränkten Bedeutung als Vorkultur im Sinne von Lentz und Tietz, die andern Verfahren nicht schlechterdings, erweitern aber in Verbindung mit ihnen den Bereich der diagnostischen Möglichkeiten ganz wesentlich.

Grimm (40) hatte bei vergleichenden Stuhluntersuchungen von sicher typhuskranken Personen folgende Ergebnisse: von 25 untersuchten Proben wurden 16 positiv gefunden und zwar:

Malachitgrünagar (Lentz und Tietz) . . . 15

Brillantgrün-Pikrinsäureagar (Conradi) . 14
Malachitgrün-Na-Sulfitagar (Padlewski) . 12
Lackmusmilchzuckeragar (Drigalski-Conr.) 9

Schuster (41) fand, daß bei seinen Untersuchungen bei positivem Ausfall auf der Drigalski-Conradi-Platte die Grünplatten (Conradi, Löffler) stets auch positiv ausfielen, nicht aber immer umgekehrt. Lentz und Tietz (21) bezifferten die Verbesserung der Diagnosen durch ihr Malachitgrün-Vorkulturverfahren mit 25% für Typhus, für Paratyphus B noch wesentlich höher. Daß die Malachitgrünvorkultur bei positivem Ausfall auf Endo- oder Drigalski-Platten versagt, haben diese Autoren nur ganz selten gesehen. Barth (32) urteilt nicht so günstig. Er konnte zwar in einer ganzen Reihe von Fällen, besonders bei verhältnismäßig alten Stühlen, die Typhusbazillen nur mit Hilfe der Malachitgrün-Vorkultur nachweisen, wo die Endoplatte negative Ergebnisse zeitigte, hat aber in einer nicht geringen Anzahl von Fällen nur durch die Endoplatten den Typhusbazillennachweis führen können, während die Malachitplatten versagten. Er kommt daher zu dem Ergebnis, die Kombination beider Verfahren zu empfehlen. Noch eine Reihe von Autoren berichtet über ähnlich günstige Erfolge mit den Farbstoffelektivplatten.

Nach dieser Diskussion der Farbstoffelektivnährböden kommen wir auf den gebräuchlichsten Elektivnährboden, das Malachitgrünverfahren, zu sprechen. Es wird auch bei uns angewendet. Wir bedienen uns im wesentlichen des Lentz- und Tietz'schen (21) Verfahrens mit der Modifikation nach Knorre (33). Als Farbstoff verwenden wir Malachitgrün Höchst krystall. chem. rein (Chlorzinkdoppelsalz) in 0,5% wässeriger Lösung. Zum üblichen sterilisierten Nähragar geben wir bis zur Neutralisation 10%ige Sodalösung zu; darüber hinaus noch 1,0 ccm derselben Sodalösung pro 100 ccm Agar, so daß leichte Alkaleszenz besteht. Dies entspricht etwa einer Wasserstoffionenkonzentration nach Michaelis von 7,4. Die Wahl der Farbstoffkonzentration geschieht durch Ausprobieren einer Versuchsreihe, die den Farbstoff in einer Anzahl von Platten mit steigender Konzentration enthält. Zur Einarbeitung z. B. geben wir von der 0,5%igen Farblösung in eine Reihe von 10 sterilen Reagensgläsern, bei 0,05 ccm beginnend, steigende Mengen bis 0,7 ccm. Dazu bringen wir je abgemessene 10 ccm obigen Agars, vermischen gut und gießen in sterile Petrischalen aus. Die 10 Platten enthalten nun den Farbstoff in Kon-

zentrationen, die von 1:40 000 auf 1:3000 ansteigen und sich um den Mittelpunkt 1:6000, wie ihn Lentz und Tietz als feststehende Konzentration angeben, gruppieren. Nach dieser erstmaligen Orientierung genügen später 3—5 Probekonzentrationen um den gefundenen Wert herum. Die Probeplatten werden je zur Hälfte mit Stämmen von B. typhi und B. coli beimpft und bebrütet. Das Wachstumsergebnis zeigt die Platte mit der optimalen Konzentration an und diese wird für die übrige Agarmenge genommen. Auf diese Weise lassen sich kleine Unterschiede in der Beschaffenheit des Agars oder der Farblösung, die leider immer einmal bestehen, durch Nachgehen mit der Konzentration ausschalten, so daß jeweils die Gleichwertigkeit des Nährbodens gesichert ist. Die ausgegossenen Platten werden getrocknet und kühl und dunkel aufbewahrt. Die Stuhlproben werden mit dem Drigalskispatel aus 1 Öse Stuhl aufgeimpft. Nach der Bebrütung werden die gewachsenen Kolonien mit 8—10 ccm steriler Kochsalzlösung abgeschwemmt. Dann erfolgt durch Verimpfen auf Endo-, Drigalski-Conradi-Platten und durch Agglutination die weitere biologische Untersuchung auf Typhusbazillen.

Für das Malachitgrünverfahren im Besonderen charakteristisch ist einmal die Tatsache, daß es eine genaue Einhaltung der Technik verlangt. Dies ist hauptsächlich bei der Einstellung der Reaktion zu beobachten. Als Reaktionsoptimum für Typhusbazillen gilt der oben genannte Alkalitätsgrad von 1,0 ccm 10%iger Sodalösung auf 100 ccm Agar unterhalb des Neutralpunktes. Knorre (33) hat berechnet, wie kleine Fehler bei der Neutralisation den Nährboden unwirksam machen können. Leuchs (20) sowie Peabody und Pratt (42) haben darauf hingewiesen, daß sowohl den verschiedenen Fabrikmarken unterschiedliche Wirksamkeit zukommt, als auch die bakterizide Kraft innerhalb derselben Marke und sogar Farbstofflösung wechseln kann. Gaethtgens und Brückner (43) fordern deshalb neben genauer Alkalieinstellung die Verwendung einheitlichen Farbstoffes, nämlich des dextrinfreien chemisch reinen Chlorzinkdoppelsalzes, und stets frischer Platten. Diese diffizile Technik, die bei kleinsten Ungenauigkeiten schon beträchtliche Fehlerquellen in sich schließt, mag als Nachteil des Verfahrens erscheinen und ist ihm auch zum Vorwurf gemacht worden. Daraus sind die ursprünglichen Versager mancher Autoren mit dem Malachitgrünverfahren zu erklären. Aber die jedesmalige Eichung auf Wirksamkeit bei der Herstellung hebt durch

Nachgehen mit der Konzentration die genannten Fehlermöglichkeiten auf. Sie garantiert die Tauglichkeit der Platte besser als ein feststehendes Rezept. Dabei ist wohl eine gute und persönliche Einarbeitung von Nutzen, die Herstellung aber nicht besonders umständlich. Die Zersetzung des Farbstoffes unter dem Einfluß des Lichts, die sich durch Abblassen kennzeichnet, wird durch Aufbewahrung der Platten im Eisschrank vermieden. Die Haltbarkeit der Platte, die von manchen Autoren (Sartorius (31)) bemängelt wird, ist so genügend garantiert.

Das Lentz und Tietz'sche Malachitgrünverfahren wird von allen Seiten gut beurteilt. Die meisten Autoren stellen es an die Spitze aller Grünnährböden. Gaethgens und Brückner's (43) Ergebnisse an großem Material veranschaulichen den absoluten und relativen Wert des Malachitgrünagars: der Nachweis der Bazillen im Stuhl von sicher Typhuskranken während der ersten und zweiten Krankheitswoche konnte in über 50 %, während der dritten Woche in über 75 % der Fälle erbracht werden. Dabei gelang der Nachweis im Durchschnitt aller Untersuchungen:

Malachitgrünagar	66 %	der Fälle
Brillantgrün-Pikrinsäureagar (Conr.)	59 %	
Chinagrünagar (Werbitzki)	53 %	
Endoagar	50 %	

Auch Grimm (40) hat, wie bereits erwähnt, mit dem Malachitgrünverfahren bessere Ergebnisse erzielt als mit Conradi, Padlewski und Drigalski-Conradi's Verfahren. Klinger (44) konnte bei Vergleichen mit dem Verfahren von Lentz und Tietz den Typhusbazillus 26mal aus dem Stuhl züchten, während es mit Drigalski-Conradi's Verfahren nur 13mal, mit Endos Verfahren nur 16mal gelang.

Wir kommen nun auf die neuen Farbstoffnährböden zu sprechen, die Sartorius auf Grund seiner Versuche vorschlägt. Sartorius gibt folgende Rezepte an: Als Stammnährboden wird 10fach verdünnte Hottinger'sche Verdauungsbrühe verwendet, der ½ % Pepton, ½ % Fleischextrakt, ½ % Kochsalz und 1½ % Agar zugesetzt werden; es kann aber auch der übliche Agar benutzt werden. Der Stammnährboden wird sterilisiert, danach wird die p h Ionenkonzentration mit m Nitrophenol nach der kolorimetrischen Methode von Michaelis eingestellt. Dies geschieht mit Normalnatronlauge und muß sorgfältig

vorgenommen werden. Von den verwendeten Farbstoffen werden Stammlösungen hergestellt, nämlich die drei Fabrikate

Grübler Leipzig: Akridinrot B in 1%iger, Dahlia B in ½%iger, Türkisblau in ½%iger Lösung;

das Fabrikat Leopold Müller Berlin: Resorzinschwarz in 1%iger Lösung.

Konzentration dieser Lösungen und p h Stufung sind für die Nährböden folgende: Auf je 100 ccm Stammnährboden gibt man von der

Akridinrot B-Lösung	7,5 ccm	bei	einer	p/h	von	8,5
Türkisblau-Lösung	2,5 „	„	„	„	„	8,5
Resorzinschwarz-Lösung	2,5 „	„	„	„	„	8,5
Dahlia B-Lösung	1,25 „	„	„	„	„	8,0

Für die Farbstoffkombinationsnährböden werden verwendet:

Akridinrot B-Lösung	5,0 ccm	zus. auf 100 ccm Agar bei p/h 8,5
Türkisblau-Lösung	1,0 ccm	
Akridinrot B-Lösung	5,0 ccm	zus. auf 100 ccm Agar bei p/h 8,5
Resorzinschwarz-Lösung	1,0 ccm	
Akridinrot B-Lösung	5,0 ccm	zus. auf 100 ccm Agar bei p/h 8,5
Dahlia B-Lösung	0,25 ccm	
Resorzinschwarz-Lösung	0,25 ccm	zus. auf 100 ccm Agar bei p/h 8,5
Türkisblau-Lösung	2,0 ccm	

Die Farbmengen werden in den flüssigen sterilisierten Nährboden gegeben und, mit diesem vermischt, in sterile Platten ausgegossen, wobei auf eine Platte etwa 15 ccm kommen; die fertigen Platten werden im Brutschrank getrocknet. Von den zu untersuchenden Stuhlproben werden einige Ösen in vorrätige Traubenzuckerboullion-Röhrchen (1 % Traubenzucker p h 8,0) gebracht und verrieben; die Röhrchen werden als Vorkultur 6 Std. in den Brutschrank gestellt. Dann werden einige Ösen aus dieser Vorkultur mit dem Drigalskispatel auf den Farbstoffplatten verteilt und 12—16 Std. im Brutschrank bei 37 ° C belassen. Weiterprüfung gewachsener Kolonien geschieht durch Verimpfung auf Endoplatten und Agglutination. Sartorius empfiehlt, von vorneherein auch gleich auf Endoplatten zu verimpfen.

Zur Technik ist zu bemerken, daß die Verwendung des Hottingernährbodens das Verfahren ziemlich umständlich macht. Ich habe des-

halb zu meinen Nachprüfungen stets mit gewöhnlicher Boullion hergestellten Agar verwendet, der ja an Stelle des mit Hottingerbrühe bereiteten treten kann. Die Frage der Vorkultur in Traubenzuckerboullion, die Sartorius zum schonenden Übergang der empfindlichen Keime aus dem Stuhlmilieu auf die Elektivnährböden empfiehlt, muß ich anders beurteilen. Die Arbeiten und Versuche Vignati's (2) haben erwiesen, daß in flüssigen Nährböden der Typhus-Coli-Bazillenantagonismus das Wachstum der Typhusbazillen beeinträchtigt. Die Säurung der Traubenzuckerboullion führt zur Überwucherung des B.typhi durch B. coli. Vignati konnte aus B. coli Kulturen Filtrate herstellen, die das Wachstum der Typhusbazillen vollkommen hemmten; durch Zusatz von Bolus alba zu den Filtraten konnte er die wachstumshemmenden Stoffe adsorbieren, so daß damit das Wachstum der Typhusbazillen nicht mehr beeinträchtigt wurde. Barth (32) hat bei Nachprüfung der Methoden von Sartorius von der Vorkultur in den meisten Fällen nur den Erfolg gesehen, daß bei reichlich vorhandenen Typhusbazillen im Stuhl die Platten nach der Kultur nur vereinzelte B. coli oder B. Proteus Kolonien aufwiesen oder völlig steril blieben. Von der Boullionvorkultur habe ich also abgesehen. Die acht oben genannten neuen Nährboden von Sartorius wurden nun von mir einer Nachprüfung unterzogen.

Um über die prinzipiell elektiven Fähigkeiten der neuen Nährböden zu entscheiden, schien es fürs erste zweckmäßiger, die Beimpfung mit Reinkulturen vorzunehmen, um negative Ergebnisse, die bei Stuhluntersuchungen immer einmal vorkommen, nicht auf die neue Methode zu beziehen. Die Elektivwirkung mußte ja bei Reinkulturversuchen am augenfälligsten sein. Ich ging folgendermaßen vor: Die Nährböden wurden genau nach den Vorschriften von Sartorius hergestellt. Als Stammnährboden entschied ich mich für den gewöhnlichen Nähragar (s. o.). Dieser wurde sterilisiert und mit Normalnatronlauge nach Michaelis genau auf die gewünschte p/h Ionenkonzentration gebracht. Die verwendeten Farbstoffe waren von derselben Herkunft, nämlich von Grübler, Leipzig und Leopold Müller, Berlin. Die Farblösung wurde durch genaues Abwiegen hergestellt, war bei der Nährbodenbereitung frisch und wurde kühl und dunkel aufbewahrt. Die Platten, von denen jede etwa 15 ccm enthielt, wurden im Brutschrank getrocknet und frisch beimpft. Die Kontrollversuche

wurden jeweils am folgenden Tage angesetzt. Zur Beimpfung verwendete ich Reinkulturen von B. typhi, B. paratyphi B und B. coli commune. Es wurden 9 Typhusbazillenstämme und 6 Paratyphusbazillenstämme aus der Sammlung des Instituts genommen. Die B. coli Stämme wurden teilweise frisch aus menschlichem Stuhl gezüchtet, teils ebenfalls der Sammlung entnommen. Alle Stämme waren neuerer Herkunft und biologisch eingehend geprüft; sie wurden in Schrägagarkulturen weitergezüchtet. Die Beimpfung der Platten gestaltete sich, wie von Sartorius angegeben, folgendermaßen: Von den Stämmen wurde auf Schrägagarröhrchen abgeimpft; sie wurden nach 18—24stündigem Brutschrankaufenthalt mit je 2 ccm Boullion abgeschwemmt und von den Abschwemmungen je eine Öse als Strichimpfung auf die Farbstoffplatten gebracht. Nach 18—24stündigem Brutschrankaufenthalt wurden die Ergebnisse abgelesen. Bei der Bewertung bezeichnete ich vollkommenes saftiges Wachstum mit ++, gutes, aber etwas dürftigeres Wachstum mit +, zartes unvollständiges Wachstum mit einzelnen Kolonien und an Stellen der Keimanhäufung mit ±, Andeutung und Spuren von Wachstum oder ganz vereinzelte Kolonien mit $\mp$ und vollkommen unterdrücktes Wachstum mit —.

Auf die graphische Darstellung der Resistenzen und die Gewinnung der „großen und reinlichen Resistenzabstände", die uns aus den Tabellen von Sartorius entgegentreten, muß noch kritisch eingegangen werden. Sartorius drückt die Wachstumswerte auf den Farbstoffplatten durch Zahlenwerte aus, indem er ++ = 20, + = 15, ± = 10, $\mp$ = 5 und — = 0 setzt. Nun errechnet er die Resistenzwerte eines Stammes aus der Summe der Wachstumswerte bei den einzelnen Konzentrationen und stellt sie als Ordinaten über einer gemeinsamen Grundlinie dar. Nehmen wir als Beispiel eine Reihe von 4 Akridinrotplatten mit fallender Konzentration, die je mit einem Stamm von B. coli und B. typhi beimpft sind. Nun sei für den B. coli Stamm in der ersten stärksten Konzentration der Wachstumswert 0, in der zweiten 5, in der dritten 10, in der vierten ebenfalls 10, so ergibt sich ein Resistenzwert von 0+5+10+10 = 25. Die Lage des Punktes wird also graphisch dargestellt durch eine Ordinate von 25 mm. Der Typhusbazillenstamm habe auf derselben Akridinrotplattenreihe die Wachstumswerte: 0, 10, 10, 20, sein Resistenzwert beträgt also 40; der zugehörige Punkt kommt 40 mm über die Grundlinie zu liegen.

In der graphischen Darstellung ergibt sich ein „großer und reinlicher Resistenzabstand" von 15 mm und dieser erweckt den Anschein, daß eine genaue und peinliche Trennung zwischen dem B. typhi und B. coli Stamm bestehe. Dies trifft aber in unserem Beispiel keineswegs zu; es bestehen nur bei zwei Konzentrationen Abweichungen und auch da wachsen eben tatsächlich immer noch beide Partner, nur etwas unterschiedlich. Ziehen wir noch in Betracht, daß die Wachstumsbewertung im Einzelfall um eine Stufe hin oder her zweifelhaft oder ungenau sein kann, so können wir den errechneten Resistenzunterschieden nicht die Bedeutung beilegen, die ihnen in der Form der graphischen Darstellung zuzukommen scheint. Um die richtige Bewertung dieser Abstände anzusetzen, muß man sich vergegenwärtigen, daß ideale Elektivverhältnisse (vollkommene Hemmung des B. coli, unbehindertes Wachstum des B. typhi) Resistenzwerte von B. typhi zu B. coli wie 80:0 ergeben müßten. Die Erwartungen auf den idealen elektiven Wirkungstyp der neuen Farbstoffe für das Typhusbazillenwachstum dürfen also nicht zu hoch gestellt werden; den Abständen in der graphischen Darstellung entsprechen nicht solch günstige Wachstumsunterschiede im Versuch. Ich habe daher bei der Darstellung meiner Versuchsergebnisse von der graphischen Methode abgesehen.

Die Versuchsreihen, deren Technik im einzelnen bereits oben beschrieben ist, wurden durch analoge Kontrollversuche, die um einen Tag später angesetzt wurden, in ihrer Richtigkeit genau bestätigt. Meine Ergebnisse waren folgende:

I. Versuchsreihe: einfache neue Farbstoffnährböden in den von Sartorius angegebenen Konzentrationen. Bebrütung 20 Std. bei 37° C.

Tabelle I.

	B. coli-Stämme 1	2	3	4	5	6	B. typhi-Stämme 1	2	3	4	5	6	B. paratyphi-B-St. 1—6
1 % Akridinrot B 7,5/100 ccm p/h 8,5	++	++	++	+	+	+	++	+	++	+	+	+	je ++
½ % Türkisblau 2,5/100 ccm p/h 8,5	—	—	—	—	—	∓	++	∓	++	∓	—	—	je ++
1 % Resorzinschw. 2,5/100 ccm p/h 8,5	—	—	∓	—	—	—	++	∓	++	∓	—	—	je ++
½ % Dahlia B 1,25/100 ccm p/h 8,0	+	±	±	±	±	∓	++	+	++	+	+	+	je ++

II. Versuchsreihe: einfache neue Farbstoffnährböden, Konzentrationen auf Grund der Ergebnisse der I. Reihe verändert. Bebrütung 20 Std. bei 37° C.

Tabelle II.

	B. coli-Stämme 1	2	3	4	5	6	B. typhi-Stämme 1	2	3	4	5	6	B. paratyphi-B-St. 1—6
1 % Akridinrot B 10,0/100 ccm p/h 8,5	—	—	—	—	—	+	++	++	++	+	+	±	je ++
½ % Türkisblau 1,5/100 ccm p/h 8,5	—	—	—	—	∓	∓	++	++	++	±	+	—	je ++
1 % Resorzinschw. 1,5 100 ccm p/h 8,5	—	—	+	—	∓	—	++	++	+	∓	+	—	je ++
½ % Dahlia B 2,5 100 ccm p/h 8,0	—	—	—	—	±	—	++	+	++	+	+	∓	je ++

III. Versuchsreihe: Kombinationsfarbstoffnährböden in den von Sartorius angegebenen Konzentrationen. Bebrütung 20 Std. bei 37° C.

Tabelle III.

	B. coli-Stämme						B. typhi-Stämme									B. paratyphi-B-St. 1—6
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
1 % Akridinrot B 5,0 ½ % Türkisblau 1,0 zus. auf 100 ccm p/h 8,5	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	je ++
1 % Akridinrot B 5,0 1 %Resorzinschw.1,0 zus. auf 100 ccm p/h 8,5	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	je ++
1 % Akridinrot B 5,0 ½ % Dahlia B 0,25 zus. auf 100 ccm p/h 8,5	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	+	+	+	+	+	je ++
1 % Res.schw. 0,25 ½ % Türkisblau 2,0 zus. auf 100 ccm p/h 8,5	—	—	—	—	—	∓	++	±	++	±	±	∓	∓	∓	+	je ++

IV. Versuchsreihe: Malachitgrünnährböden. Konzentration nach dem oben genannten Verfahren erprobt. Bebrütung 20 Std. bei 37° C. Mehrfache Bestätigung durch Kontrollversuche

Tabelle IV.

	B. coli-Stämme						B. typhi-Stämme									B. paratyphi-B-St. 1—6
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
½ % Malachitgrün 3,2/100 ccm p/h = 7,2	±	—	—	—	—	—	++ Gelbfärbung	+	++	∓	∓	∓	+	+	±	je ++ Gelbfärbung

Wachstum von Paratyphusbazillen

In Übereinstimmung mit Sartorius und Barth ist zu beobachten, daß in allen Beimpfungsversuchen das Wachstum der Paratyphusbazillen gleichmäßig gut und kräftig ist. Hier besteht gegenüber

dem B. coli tatsächlich ein „großer und reinlicher Resistenzabstand." Die neuen Nährböden können im Versuch mit Reinkulturen für die Elektivzüchtung der Paratyphusbazillen dem Malachitverfahren gleichwertig an die Seite treten. Die wachstumshemmende Konzentration aller dieser Farbstoffe einschließlich des Malachitgrüns liegt eben für Paratyphusbazillen weit über der für Colibazillen. Soweit besteht Übereinstimmung mit Sartorius.

Wachstum von Typhusbazillen.

Akridinrot B: Die Stämme von B. coli und B. typhi zeigen in Tab. I im Durchschnitt gleiches Wachstum; dieses ist reichlich und so wenig gehemmt, daß von einem Resistenzunterschied der beiden Arten nicht gesprochen werden kann. Die nur sehr geringe Hemmung des B. coli gab Veranlassung, in der II. Versuchsreihe die Farbstoffkonzentration zu verstärken. Die Ergebnisse (Tab. II) waren dabei wesentlich besser, doch traten bereits Anzeichen von Hemmung des B. typhi auf, während ein B. coli-Stamm noch wuchs. Es besteht also keine Möglichkeit einer vollkommen reinlichen Trennung aller Stämme. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei den Kombinationsnährböden (Tab. III). Dort ist bei allen Akridinrotkombinationen die Hemmung des B. coli ungenügend.

Türkisblau: In der ersten Versuchsreihe (Tab. I) wurden alle Stämme der Colibazillen im Wachstum unterdrückt oder doch stark gehemmt. Dieselben Verhältnisse lagen aber auch bei mehreren Typhusbazillenstämmen vor. Da aber dies unter keinen Umständen der Erfolg einer Elektivzüchtung sein darf, mußte die Farbstoffkonzentration herabgesetzt werden (Tab. II). Dabei ergab sich eine Verbesserung, aber kein eigentlicher Erfolg. Bei der Kombination mit Akridinrot B (Tab. III) war ein erhebliches Wachstum sowohl aller B. typhi-Stämme wie auch aller B. coli-Stämme zu beobachten. Mit Resorzinschwarz zusammen wurden einzelne Typhusstämme bereits stark gehemmt. Auch bei Türkisblau liegen also absolut keine idealen Resistenzverhältnisse vor.

Resorzinschwarz: In der Originalkonzentration nach Sartorius wurden einige Typhusbazillenstämme bereits unterdrückt (Tab. I). So mußte die Konzentration in der II. Versuchsreihe gesenkt

werden. Auch dabei (Tab. II) wurden noch einzelne Stämme des B. typhi gehemmt, während B. coli z. T. ebenfalls wuchs. In der Kombination mit Türkisblau kam eine stark hemmende Wirkung zum Ausdruck, die zwar vorwiegend das B. coli betraf, aber auch einzelne Typhusbazillenstämme ergiff (Tab. III).

Dahlia B: Das reichliche Wachstum aller Stämme des B. coli in der ersten Versuchsreihe (Tab. I) machte eine Unterscheidung von den Typhusbazillen unmöglich. Die stärkere Konzentration der II. Versuchsreihe ergab wesentlich bessere Verhältnisse, doch konnte eine klare Scheidung der beiden Bakterienarten insgesamt nicht erzielt werden. Dasselbe gilt von der Kombination mit Resorzinschwarz (Tab. III).

Malachitgrün: (Tab. IV). Die Beimpfungsversuche auf die Malachitgrünplatten wurden jeweils mit den andern Versuchsreihen angesetzt und unterlagen genau den gleichen Bedingungen. Die Vergleichswerte wurden durch eine große Anzahl von Kontrollen gesichert. Außer der Wachstumsgröße bzw. -Differenz war für Typhus- und Paratyphus-Bazillen die Gelbfärbung des Nährbodens ein weiterer wichtiger Indikator für Wachstum oder Wachstumshemmung. Diese Färbung konnte bei den Nährböden von Sartorius nie beobachtet werden. Wie vorauszusehen war, zeigten auch die Malachitgrünnährböden für Paratyphusbazillen eine vollständige Trennungsmöglichkeit vom B. coli, nicht aber für Typhusbazillen. Immerhin sind die Elektivverhältnisse beim Malachitgrün gleich gut, ja vielfach besser als die der untersuchten vier Farbstoffe und ihrer Kombinationen.

Beim Überblick über die Beimpfungsversuche mit Reinkulturen komme ich zu folgendem Ergebnis: Für das Wachstum der Typhusbazillen zeigen die von Sartorius angegebenen Farbstoffe weder allein noch in Kombination untereinander ideale Elektivverhältnisse. Ihre Fähigkeiten werden von der bisher gebräuchlichen Malachitgrünplatte erreicht, ja teilweise überboten. Eine vollkommene Hemmung des B. coli bei unverändertem Wachstum der Typhusbazillen kann von keiner Methode erreicht werden, auch von der Malachitgrünplatte nicht. Einzelne Stämme, bei den Typhusbazillen z. B. Stamm 1 und 3 zeigen in allen Versuchen große Wachstumsenergie oder Resistenz; andere, z. B. Stamm 6, werden leichter gehemmt als manche B. coli-

Stämme. Auch aus den Versuchen geht also die schon erwähnte Tatsache hervor, daß die Resistenzbreiten für Typhus- und Colibazillen teilweise übereinandergreifen. Deshalb läßt sich eine vollkommen reinliche Trennung der beiden Arten nicht erzielen und das Elektivzüchtungsverfahren muß seine Aufgabe auf die Methode der Vorkultur im Sinne von Lentz und Tietz als einer relativen Anreicherung beschränken.

Der zweite Teil meiner Versuche erstreckte sich auf die Beimpfung der neuen Farbstoffplatten mit Stuhlproben. Es wurden Stühle, die dem Institut zur Untersuchung auf Typhus- oder Paratyphusbazillen eingesandt wurden, zur Beimpfung verwendet. Aus den Proben wurde eine Öse auf die Platten gebracht und mit dem Drigalski-Glasspatel verteilt. Die Betrübung erfolgte bei 37° C und dauerte 16–20 Stunden. Gleichzeitig wurden Malachitgrün- sowie Endo- und Drigalski-Conradi-Platten, wie sonst üblich, beimpft. Die auf den Farbstoffplatten gewachsenen Kolonien wurden durch Weiterverimpfung auf Endoagar und Agglutination genau differenziert. Zudem brachte ich die Keime jeweils durch Färbung nach Gram und im hängenden Tropfen zu Gesicht.

I. Versuchsreihe: einfache Farbstoffnährböden in den von Sartorius angegebenen Konzentrationen. Stuhlprobe der Patienten J. aus der Medizinischen Klinik, Typhus, 4. Krankheitswoche. Bazillen im Stuhl durch Endo- und Drigalskiverfahren spärlich nachgewiesen.

Akridinrot B: sehr zahlr., helle, schleimige Kol.
reichl. dunklere dicke Kol.

Türkisblau: mäßige große, helle schleimige Kol.
vereinzelt kleinere dunkle Kol.

Resorzinschw.: vereinzelt dunkle schleimige Kol.
ganz vereinzelt kleine blaue Kol.

Dahlia B: zahlreiche große schleimige Kol.
vereinzelt kleine blaue Kol.

Malachitgrün: einzelne große gelbl. schleimige Kol.
wenige kleine tiefgrüne Kol.

Bei der weiteren Differenzierung erwiesen sich alle Stämme als B. coli. Typhusbazillen konnten nicht gefunden werden.

II. Versuchsreihe: Farbstoffplatten mit veränderter Konzentration (vgl. Tab. II). Ausstrich von 2 Stuhlproben der Pat. S. und H. je auf eine Plattenserie. Auf Endo- und Drigalskiagar keine Typhusbazillen gewachsen.

	1. Stuhlprobe (Pat. S.)	2. Stuhlprobe (Pat. H.)
Akridinrot B:	zahlr. größ. schleim. Kol. reichl. kleinere Kol.	zahlr. große Kol. vereinz. kleine Kol.
Türkisblau:	steril	zahlr. Kol.
Resorzinschw.:	vereinz. mittelgr. Kol.	ganz vereinz. kleine Kol.
Dahlia B:	steril	zahlr. dicke schleim. Kol.
Malachitgrün:	steril	reichl. schleim. Kol.

Sämtliche Kolonien als B. coli identifiziert. Keine Typhusbazillen.

III. Versuchsreihe: Farbstoffkombinationsplatten nach der von Sartorius angegebenen Konzentration. Beimpfung mit 2 Stuhlproben der Pat. R. und L. auf je eine Plattenserie. Auf Endo- und Drigalskiagar keine Typhusbazillen gefunden.

	1. Stuhlprobe (Pat. R)	2. Stuhlprobe (Pat. L.)
Akridinrot B + Türkisblau:	zahlr. kleine blasse, einz. fette große Kol.	massenhaft kleine blasse Kol.
Akridinrot B + Res.schwarz:	ganz vereinz. größere und kleine blasse Kol.	massenhaft kleine blasse Kol. zahlr. große fette Kol.
Akridinrot B + Dahlia B:	ganz vereinz. größere Kol.	massenhaft kleine blasse Kol. zahlr. große fette Kol.
Res.schwarz + Türkisblau:	zahlr. kleine Kol. vereinz. fette große Kol.	massenhaft kleine blasse Kol.
Malachitgrün:	zahlr. kleine Kol.	massenhaft kleine blasse Kol. vereinz. große schleim. Kol.

Alle Kolonien als B. coli erwiesen.

Besehen wir uns diese Ergebnisse näher, so fällt insbesondere sofort auf, daß von einer vollkommenen Hemmung des B. coli, die bei den Versuchen mit Reinkulturen noch relativ günstig war, nicht die Rede sein kann. Am geringsten war die hemmende Wirkung jeweils beim Akridinrot B, so daß hier sogar eine relative Anreicherung der Typhusbazillen bezweifelt werden muß. Bei den anderen Farbstoffen lagen die Wachstumsverhältnisse ähnlich wie bei den Malachitgrünplatten: Durchschnittlich war eine Unterdrückung zahlreicher B. coli-

Stämme zu bemerken, während einzelne unbehindertes Wachstum zeigten. Bemerkenswert ist noch, daß der Typhusbazillennachweis in einem Fall mit den Elektivverfahren versagte, während er auf Endo- und Drigalski-Conradiagar gelang. Auch eine Bestätigung der Tatsache, daß die Elektivverhältnisse bei der Stuhlflora nicht so günstig sind, wie bei der Beimpfung mit Laboratoriumsstämmen, kann aus den Versuchen entnommen werden. Ein Vorteil der neuen Nährböden von Sartorius gegenüber dem bisherigen Malachitgrünverfahren war bei der Beimpfung mit Stuhlproben nicht ersichtlich.

Die von Barth (32) vorgenommene Nachuntersuchung der neuen Farbstoffnährböden erstreckt sich vorwiegend auf die praktische Verwendbarkeit. Die Beurteilung dieses Autors lautet folgendermaßen: „Bei der Beimpfung mit Reinkulturen wurde ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Malachitgrünverfahren und den neuen Nährböden nicht gefunden. Bei den Faecesuntersuchungen ergaben von 70 Fällen (Stühle von Typhuskranken oder Bazillenträgern) ein positives Resultat:

Malachitgrünagar . . .	15 Fälle
Dahlia B Agar	9 Fälle
Resorzinschwarzagar . .	6 Fälle
Türkisblauagar	5 Fälle
Akridinrot B Agar . . .	4 Fälle
Endoagar	23 Fälle

Von den Farbstoffnährböden liefert Malachitgrünagar die weit besten Ergebnisse. In großem Abstand folgt Dahlia B, ganz unbefriedigend sind Resorzinschwarz, Türkisblau und Akridinrot B. Unsere Resultate mit den Sartorius-Nährböden sind also nicht günstig gewesen.“ Soweit Barth's Beurteilung.

Fassen wir die eigenen Versuchsergebnisse über die Malachitgrünnährböden einerseits, die neuen Sartorius-Nährböden andererseits vergleichend zusammen, so kommen wir zu nachstehenden Schlußfolgerungen:

1. Weder Malachitgrün noch die vier von Sartorius vorgeschlagenen Farbstoffe sind imstande, die Resistenzbreiten der Typhus- und der Colibazillen-Stämme vollständig von einander zu trennen.
2. Die von Sartorius gefundenen günstigen Elektivverhältnisse der neuen Farbstoffe für Typhusbazillen wurden durch meine Versuche nicht bestätigt.

3. Die Elektivverhältnisse des nach der beschriebenen Methode hergestellten Malachitgrünagars sind gleich günstig oder besser als die der Sartorius-Farbstoffe.
4. Bei der praktischen Anwendung in der Typhusbazillenzüchtung aus dem Stuhl ist das Malachitgrünverfahren den Methoden von Sartorius überlegen, mindestens aber ebenbürtig; die neuen Methoden in die Praxis einzuführen ist demnach nicht nötig.
5. Auch die Malachitgrünplatte versagt gelegentlich, während mit dem Endoverfahren der Nachweis gelingt. Als heute bestes Verfahren hat die Kombination von Malachitgrün-Vorkultur und direkter Beimpfung auf Endo- und Drigalskiplatte zu gelten.
6. Es gelingt leichter, Coli- gegen Paratyphusbazillen als gegen Typhusbazillen abzugrenzen.

Zum Schluß erlaube ich mir noch, Herrn Prof. Dr. K. Wolf für die Überlassung des Themas, Herrn Privatdozent Dr. Saleck für die liebenswürdige Unterstützung meinen besten Dank auszusprechen.

Literatur-Verzeichnis.

1. Kitasato, Zschr. f. Hyg. 1888, III S. 404.
2. Vignati, Zbl. f. Bakt. Abt. I Bd. 107, S. 67, 1928.
3. Kitasato, Zschr. f. Hyg. 1889, VII S. 515.
4. Petruschky, Zbl. f. Bakt. 1889, VI S. 628, 657.
5. Drigalski und Conradi, Zschr. f. Hyg. 1902 B. 39.
6. Endo, Zbl. f. Bakt. 1903 Bd. 35.
7. Smith, Zbl. f. Bakt. 1890 Bd. 7 und 8.
8. Germano und Maurea, Zieglers Beiträge 1893 Bd. 12.
9. Widal, Sem. méd. 1891 S. 415 und 451.
10. Scheffler und Rothberger, Zbl. f. Bakt. 1900 Bd. 28.
11. Capaldi, Zschr. f. Hyg. 1896 Bd. 23.
12. Elsner, Zschr. f. Hyg. 1895 Bd. 21.
13. Kruse, Zbl. f. Bakt. 1894 Bd. 15.
14. Remy, Annales Pasteur 1900 Bd. 14.
15. Mac Concey, Zbl. f. Bakt. 1900 Bd. 29.
16. Conradi, Deutsche med. Wochenschr. 1906 Nr. 2.
17. Gaehtgens, Zbl. f. Bakt. 1905 Bd. 39.
18. Hoffmann und Ficker, Hyg. Rundschau 1904 Bd. 14.
19. Löffler, Deutsche med. Wochenschr. 1903 Nr. 36.
20. Leuchs, Dieselbe 1906 Nr. 33.
21. Lentz und Tietz, Münchner med. Wochenschr. 1903 Nr. 49.
22. Kindborg, Zbl. f. Bakt. 1908, Bd. 46.
23. Padlewski, Hyg. Rdschau 1909 Nr. 9.
24. Bitter, Münchner med. Wochenschr. 1911 Nr. 13.
25. Werbitzki, Arch. f. Hyg. 1909 Bd. 61.
26. Conradi, Münchner med. Wochenschr. 1908 S. 1523.
27. Mandelbaum, Dieselbe 1909 Nr. 48.
28. Arisawa, Zbl. f. Hyg. 1928 Bd. 17, S. 817.
29. Jshiyama, Zbl. f. Bakt. 1929 Bd. 111, S. 24.
30. Sartorius, Zbl. f. Bakt. 1928 Bd. 107, S. 134 und 398; Bd. 108 S. 313.
31. Derselbe, Zschr. f. Hyg. 1928 Bd. 108, S. 637.
32. Barth, Zschr. f. Hyg. 1929 Bd. 109, S. 611.
33. Knorre, Zbl. f. Bakt. I 1917 Bd. 79, S. 118.
34. Kilian, Zschr. f. Hyg. 1924 Bd. 103, S. 196.
35. Raubitschek und Natonek, Zbl. f. Bakt. I 1913 Bd. 69, S. 241.
36. Vial, Hyg. Rdschau 1907 Nr. 12.
37. Fürth, Zbl. f. Bakt. 1908 Bd. 46.
38. Levi und Gaehtgens, Arb. aus d. kais. Gesheitsamt 1907 Bd. 25, S. 240.
39. Kolle, Arb. aus d. Inst. f. exp. Ther. Frankfurt 1924 H. 17,
40. Grimm, Hyg. Rundschau 1909 Nr. 14.
41. Schuster, Dieselbe 1910 Nr. 11.
42. Peabody und Pratt, Zbl. f. Bakt. 1908 Bd. 45, S. 550.
43. Gaehtgens und Brückner, Zbl. f. Bakt. 1910 Bd. 53, S. 559.
44. Klinger, Diss. Straßburg 1904.

Lebenslauf.

Am 12. III. 1907 wurde ich, Erich, Otto U n s e l d, als Sohn des Kaufmanns Jakob Unseld in Ulm a. D. geboren.

Ich besuchte die Elementarschule in Ulm und durchlief anschließend das Realgymnasium daselbst bis zur Reifeprüfung im Frühjahr 1925.

Im S.S. 1925 studierte ich in Tübingen die Naturwissenschaften, dann wandte ich mich der Medizin zu, um im Frühjahr 1927 in Tübingen das Physikum abzulegen. Die klinischen Semester verbrachte ich in Kiel, München und Tübingen. Dort legte ich im S.S. 1930 das medizinische Staatsexamen ab.